

EKSPRESI INSULIN PADA PANKREAS MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIINDUKSI DENGAN STREPTOZOTOCIN BERULANG

*The Expression of Insulin on Pancreas of Repeat Streptozotocin Induced Mice (*Mus musculus*)*

Erwin¹, Etriwati², Muttaqien³, Tri Wahyu Pangestiniingsih⁴, dan Sitarina Widyarini⁵

¹Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁵Bagian Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: erwin2102@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui ekspresi insulin pada pankreas mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi streptozotocin berulang dengan pewarnaan imunohistokimia yang berguna sebagai hewan model diabetes melitus. Tiga puluh ekor mencit jantan galur Balb-C, umur 12-14 minggu dengan bobot badan 30-40 g dikelompokkan menjadi 2 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri atas 15 ekor. Kelompok 1 (K1) diberikan pelarut streptozotocin, sedangkan kelompok 2 (K2) diberikan streptozotocin dengan dosis 40 mg/kg bobot badan dalam 50 mM natrium sitrat bufer pH 4,5 secara intraperitoneal sebanyak 0,5 ml selama 5 hari berturut-turut. Hewan percobaan dari masing-masing kelompok dieutanasia sebanyak 2 ekor pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28 setelah perlakuan, selanjutnya mencit diperfusi dan dinekropsi untuk mengambil jaringan pankreas sebagai sampel pemeriksaan imunohistokimia dengan metode streptavidin peroksidase menggunakan antibodi mouse anti-insulin (1:300). Berdasarkan uji statistik menggunakan analisis varian, ekspresi insulin pada sel beta Langerhans pankreas K1 lebih tinggi dibandingkan K2 ($P < 0,05$). Waktu pengamatan dan interaksi antara kelompok dan waktu pengamatan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Induksi dosis rendah streptozotocin secara berulang dapat menurunkan jumlah ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin.

Kata kunci: streptozotocin, diabetes melitus, insulin, pankreas, hewan model

ABSTRACT

The purpose of this study is to observe the expression of insulin on pancreas of repeat streptozotocin induced mice using immunohistochemical staining to produce diabetes mellitus animal model. Thirty male mice Balb-C strain, aged 12-14 weeks, weight 30-40 g, were divided into 2 treatment groups, each group consisted of 15 individuals. Group (K1) were treated with sodium citrate buffer, while Group 2 (K2) is treated with streptozotocin at a dose of 40 mg/kg bw in 50 mM sodium citrate buffer pH 4.5 intra-peritoneally, 0.5 ml for 5 consecutive days. Every two animals from each group of the experiment were done euthanasia on day 0, 7, 14, 21, and 28 after the administration of treatment, subsequently the mice were done a perfusion of fixative solution and necropsied to collect the pancreas for immunohistochemical examination by streptavidin peroxidase method using anti-insulin mouse antibody (1:300). Based on statistical analysis using ANOVA, the expression of insulin in group 1 pancreas were higher than group 2 which showed a significant difference ($P < 0.05$), as well as the time of observation and interaction between group and time showed significant differences ($P < 0.05$).

Key words: streptozotocin, diabetes mellitus, insulin, pancreas, animal model

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan sekumpulan gangguan pada tubuh yang timbul akibat gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein dengan banyak sebab lainnya. Diabetes melitus ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah yang melebihi batas normal (hiperglikemia) akibat peningkatan glukoneogenesis dan glikogenolisis. Menurut data World Health Organization (WHO), prevalensi DM di seluruh dunia diproyeksikan meningkat dari 2,8% pada tahun 2000 menjadi 4,4% pada tahun 2030 dan jumlah tersebut diperkirakan terus meningkat (Wild *et al.*, 2004).

David *et al.* (2002) melaporkan dari 16 juta orang di Amerika Serikat yang menderita DM, 20% penderita dengan ulkus kaki diabetes mengalami gangguan homeostasis aliran darah arterial, 50% mengalami diabetes neuropati, dan 30% mengalami 2 kondisi tersebut. Neuropati otonom merupakan salah satu

komplikasi yang terjadi pada 40% penderita DM yang telah lebih dari 10 tahun, apabila kasus asimtomatik dimasukkan maka jumlahnya mencapai 50%. Kondisi DM sering diikuti dengan komplikasi berbagai gangguan metabolisme tubuh baik yang bersifat akut maupun kronis. Komplikasi akut ditandai dengan tingginya kadar badan keton dalam darah (ketosis), sedangkan komplikasi kronis berupa gangguan pada dinding arteri yang diawali dengan disfungsi endotel akibat hiperglikemia atau tingginya kadar glukosa darah (King *et al.*, 1993).

Berdasarkan etiologinya DM dibagi menjadi DM tipe 1 dan DM tipe 2. Diabetes mellitus tipe 1 disebabkan oleh reaksi autoimun terhadap sel beta Langerhans pankreas, sehingga produksi insulin sangat sedikit. Diabetes melitus tipe 2 paling sering ditemukan, terutama yang disebabkan oleh berkurangnya jumlah reseptor insulin pada permukaan sel. Hiperglikemia dan penurunan berat badan merupakan gejala spesifik dari DM tipe 1. Di samping

itu, pada kondisi DM tipe 1 juga ditemukan gejala klinis seperti poliuria, polidipsia, dan polifagia. Hiperglikemia disebabkan oleh menurunnya sekresi insulin sehingga meningkatnya glukosa yang beredar dalam darah (Nugroho, 2006).

Percobaan penelitian mengenai DM dengan menggunakan hewan model didasarkan pada patogenesis penyakit tersebut pada manusia yang bersifat kronis atau berlangsung menahun. Pada saat ini telah banyak penelitian menggunakan hewan model yang secara patologis dibuat menderita DM. Kondisi patologis pada hewan model dibuat bertujuan melakukan pencegahan, mengetahui patogenesis penyakit, menetapkan diagnosis, dan terapi yang digunakan dalam penanganan penyakit DM. Meskipun demikian, kondisi patologis hewan model tersebut tidak sepenuhnya menggambarkan kondisi patologis secara riil pada manusia. Pada hewan model DM sering disebabkan akibat pemberian *streptozotocin*, alokan, asam urat, asam dehidroaskorbat, asam dialurat, dan asam ksanturenat yang dapat mengakibatkan kerusakan pada sel beta Langerhans pankreas. *Streptozotocin* bekerja dengan cara membentuk radikal bebas sangat reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA), sehingga menyebabkan gangguan produksi insulin oleh sel beta Langerhans pankreas (Wilson dan LeDoux, 1989). Szkudelski (2001) menyatakan bahwa *streptozotocin* memasuki sel beta Langerhans pankreas melalui *glucose transporter 2* (GLUT 2) dan menyebabkan alkilasi. Hal ini didahului oleh pembatasan pembentukan adenosin trifosfat pada mitokondria akibat pembentukan radikal bebas, peningkatan enzim *xanthine oxidase* dan penghambatan siklus Krebs.

Sebagai salah satu kelenjar endokrin, pankreas bertanggung jawab dalam mengatur kadar glukosa darah. Perubahan kadar glukosa dalam plasma mengakibatkan penyesuaian sekresi insulin untuk mengembalikan kadar glukosa darah pada rentang yang normal. Insulin merupakan hormon anabolik utama yang meningkatkan cadangan energi. Pada semua sel, insulin meningkatkan kerja enzim yang mengubah glukosa menjadi bentuk cadangan energi yang lebih stabil yaitu glikogen (Davani, 2003). Insulin memegang peranan penting dalam proses metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Gejala awal DM berhubungan dengan efek langsung dari kadar glukosa darah yang tinggi. Jika kadar glukosa darah puasa sampai di atas 160-180 mg/dl, maka glukosa akan dikeluarkan melalui urin. Jika kadarnya lebih tinggi lagi, ginjal akan membuang air tambahan untuk mengencerkan sejumlah besar glukosa yang hilang. Karena ginjal menghasilkan urin dalam jumlah yang berlebihan, maka penderita sering urinasi dalam jumlah yang banyak (*poliuria*). Akibatnya, maka penderita merasakan haus yang berlebihan sehingga banyak minum (*polidipsia*) (Soegondo, 2007).

Berdasarkan cara pembuatannya hewan model DM dibedakan menjadi dua yaitu terinduksi (*induced*) dan

spontan (*spontaneous*). Model terinduksi dilakukan melalui pankreastomi, senyawa kimia (diabetogenik), dan virus, sedangkan model spontan dilakukan menggunakan tikus *biobreeding*, atau mencit *non-obese diabetic* (NOD) (Nugroho, 2006). Oleh karena itu, maka perlu dilakukan suatu penelitian untuk mengetahui ekspresi insulin pada pankreas mencit yang menderita DM akibat induksi *streptozotocin* dengan dosis rendah berulang dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi *mouse* terhadap insulin dengan waktu pengamatan yang berbeda.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan 30 ekor mencit jantan galur *Balb-C* umur 12-14 minggu dengan bobot badan 30-40 g. Hewan percobaan secara acak dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok berjumlah 15 ekor mencit. Kelompok 1 (K1) diberi natrium sitrat bufer pH 4,5 sebagai kontrol negatif, sedangkan kelompok 2 (K2) diberi perlakuan DM melalui injeksi *streptozotocin* 40 mg/kg bobot badan dalam natrium sitrat bufer pH 4,5 secara intraperitoneal sebanyak 0,5 ml selama 5 hari berturut-turut. Hewan percobaan dari masing-masing kelompok dieutanasi sebanyak 2 ekor pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28 setelah perlakuan. Selanjutnya mencit diperfusi dan dinekropsi untuk diambil jaringan pankreas, kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia terhadap pankreas menggunakan antibodi *mouse* anti-insulin (1:300). Irisan pankreas yang telah diwarnai dengan antibodi *mouse* anti-insulin dievaluasi dengan cara menghitung sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin (berwarna coklat) dengan pembesaran 40x. Ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin dihitung berdasarkan jumlah sel yang imunoreaktif dari 100 sel yang dihitung.

Perfusi Sampel

Mencit dianastesi dengan ketamin hidroklorida dengan dosis 20 mg/kg bobot badan secara intramuskulus. Dalam keadaan teranastesi rongga toraks dibuka dan diperfusi secara intrakardial dengan NaCl fisiologis yang ditambah *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) dengan kecepatan 5 ml/menit pada suhu 38° C sebagai *pre-rinse* melalui ventrikel kiri. Setelah jantung membesar karena terisi larutan *pre-rinse*, maka atrium kanan dibuka dengan cara digunting untuk mengeluarkan larutan *pre-rinse*. Apabila larutan yang keluar tidak lagi mengandung darah, larutan perfusi diganti dengan paraformaldehid 2% dalam bufer fosfat 0,1 M sebagai larutan perfusi. Setelah proses perfusi selesai, hewan didekapitasi, kemudian jaringan pankreas diambil dan disimpan dalam larutan fiksasi paraformaldehid 2% dalam bufer fosfat 0,1 M.

Pewarnaan Imunohistokimia

Potongan jaringan pankreas yang telah terfiksasi pada gelas objek dipanaskan selama 2 jam pada suhu

60° C. Deparafinasi dan rehidrasi dengan xilol I, xilol II, xilol III dan etanol absolut I, II dan III, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%. Preparat tersebut dicuci dengan larutan *phosfat buffer solution* (PBS), *blocking* endogenous peroksidase dengan larutan H₂O₂ 3% dalam aquades selama 30 menit, kemudian baru dicuci dengan larutan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan ultra V *block* selama 5 menit dengan *goat serum* dan ditetaskan antibodi primer *mouse anti-insulin* (1:300) selama satu malam dalam refrigerator, kemudian dicuci dengan larutan PBS. Antibodi sekunder yang digunakan adalah *biotinylated goat anti-polyvalent* selama 10 menit, kemudian dicuci dengan larutan PBS. Konjugat enzim *streptavidin peroxidase* ditambahkan dan dicuci lagi dengan larutan PBS. Substrat dan kromogen 3,3' *diaminobenzidine* (DAB) ditambahkan, lalu diinkubasikan selama 10 menit pada suhu ruangan dalam suasana gelap. Langkah terakhir, dicuci dengan larutan akuades dan untuk mendapatkan hasil yang baik dilakukan *counter stain* dengan hematoxilin selama 10 detik, dicuci dengan air mengalir, dan akuades. Kemudian, didehidrasi dengan etanol bertingkat, *clearing* dengan *xilol*, dan *mounting* permanen dengan balsem kanada (Lab Vision, Cat#MS-1378-PO).

Data kuantitatif ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin dianalisis menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial. Untuk melihat perbedaan antara masing-masing waktu pengamatan dilanjutkan dengan uji Duncan. Semua data tersebut diolah dengan program SPSS 18.

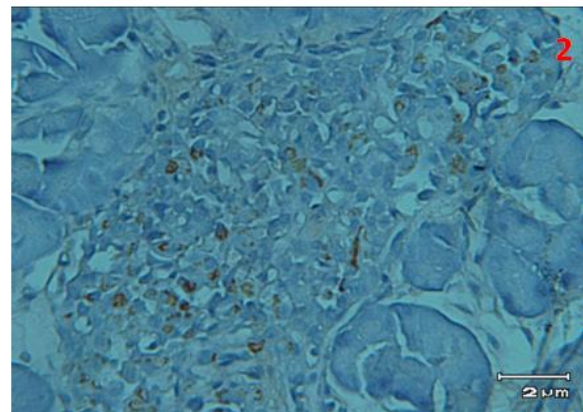
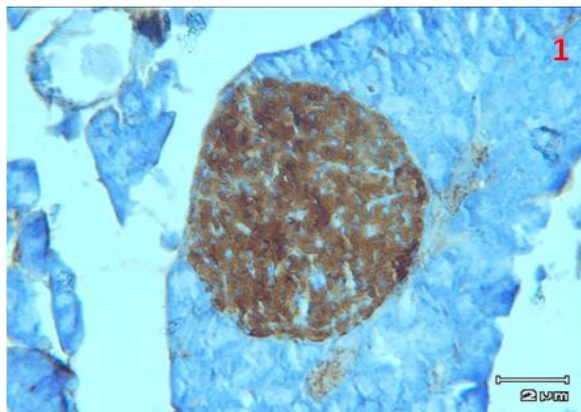
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian, induksi *streptozotocin* dengan dosis rendah (40 mg/kg bobot badan) sebanyak 5 hari berturut-turut menyebabkan DM yang bersifat *reversible*. Penilaian pada irisan jaringan pankreas yang diwarnai dengan antibodi terhadap insulin dilakukan dengan menghitung ekspresi sel-sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin (berwarna coklat) dari 100 sel yang dihitung (Gambar 1). Ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin antara kedua kelompok perlakuan

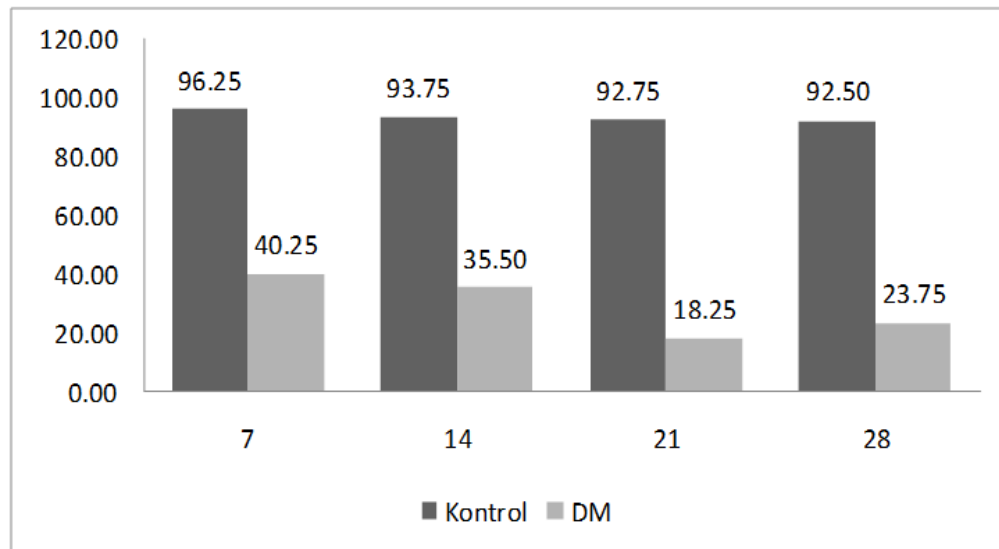
menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Pada K2 penurunan ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin terjadi pada hari ke-7, 14, dan terus menurun sampai hari ke-21 yang berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan K1. Pada hari ke-28 ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin pada K2 mengalami peningkatan yang signifikan dengan K1 ($P < 0,05$) seperti yang disajikan pada Gambar 2. Secara statistik, ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin pada K1 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$), sedangkan pada K2 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$).

Penurunan ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin menandakan berkurangnya sintesis insulin oleh sel-sel tersebut, sehingga pemberian antibodi terhadap insulin (pewarnaan imunohistokimia) hanya bereaksi dengan sel-sel yang masih menghasilkan insulin. Penurunan sintesis insulin menandakan kerusakan sel beta Langerhans pankreas oleh induksi *streptozotocin*. *Streptozotocin* adalah suatu senyawa *glukosamine-nitrosouren* seperti agen *alkilating* lainnya pada kelas *nitrosoure*, *streptozotocin* menimbulkan toksik dengan menyebabkan kerusakan pada DNA sel. Di dalam sel, *streptozotocin* serupa dengan glukosa yang diangkut oleh protein pengangkut glukosa yaitu GLUT2, tapi tidak dikenali oleh protein pengangkut glukosa lainnya (Schnedl *et al.*, 1994; Wang dan Gleichmann, 1998).

Schnedl *et al.* (1994) menyatakan selain merusak sel-sel beta Langerhans pankreas, *streptozotocin* juga dapat bersifat toksik pada ginjal, reaksi alergi, kerusakan sel darah putih, platelet, DM, dan jika diberikan pada pasien hamil akan menimbulkan cacat yang serius pada anak yang akan dilahirkan. Salah satu mekanisme *streptozotocin* menyebabkan terjadinya DM berkaitan dengan pembentukan radikal bebas diantaranya NO, O₂, dan H₂O₂ yang dapat menyebabkan fragmentasi DNA sel akibat sitotoksik *streptozotocin*. Radikal bebas memiliki waktu paruh yang sangat pendek hanya dalam satuan mikrodetik (Utomo *et al.*, 1991). Oleh karena itu, radikal bebas sangat reaktif dan dapat menimbulkan kerusakan di berbagai bagian sel antara lain kerusakan membran sel, protein, dan DNA.



Gambar 1. Foto mikrografi ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin (warna coklat) hari ke-21 (1= K1, kontrol; 2= K2, diabetes melitus).



Gambar 2. Rata-rata ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin (%)

Dampak kerusakan berupa proses penuaan yang menyebabkan terjadinya peroksida lipid. *Streptozotocin* merupakan zat yang dapat mengakibatkan alkilasi yang secara langsung memetilasi DNA, menyebabkan DNA *strand breaks*, sintesis DNA yang tidak terjadwal, penambahan DNA, aberasi kromosomal, *micronuclei*, *sister chromatid exchanges*, dan kematian sel beta Langerhans pankreas (Muhilal, 1991).

Pada hari ke-28 ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin sudah kembali meningkat, akibat regenerasi sel beta Langerhans pankreas (warna coklat lebih banyak). Perbedaan yang terjadi pada masing-masing waktu pengamatan K2 diakibatkan oleh induksi *streptozotocin*, yang diperantarai oleh sistem imun untuk merusak sel beta Langerhans pankreas secara perlahan-lahan. Sel beta Langerhans pankreas merupakan golongan sel stabil yang mampu berproliferasi sepanjang hidupnya, sehingga sel beta Langerhans pankreas kembali mensintesis insulin (McGavin dan Zachary, 2007).

KESIMPULAN

Induksi dosis rendah *streptozotocin* secara berulang dapat menurunkan jumlah ekspresi sel beta Langerhans pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih dan penghargaan kepada Lembaga Penelitian Universitas Syiah Kuala atas kepercayaan dana yang diberikan melalui Hibah Penelitian Dosen Muda DIPA Unsyiah Tahun Anggaran 2012 Nomor: 2343/UN11/LK-PNBP/2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Davani, B. 2003. Increased Glucocorticoid Sensitivity in Pancreatic β -Cells: Effects on Glucose Metabolism and Insulin Release. **Thesis**. Karolinska Institutet. Stockholm. Sweden.
- David, E.S. 2002. Pankreas: Metabolisme Glukosa dan Diabetes Melitus. Dalam **Patofisiologi Konsep Klinis Proses-proses Penyakit**. (Diterjemahkan Pendit, B.U., H. Hartanto., P. Wulansari, dan D.A. Mahanani). Edisi 6. Volume 2. Penerbit Buku Kedokteran. EGC, Jakarta.
- King, H., M. Rewers, and W.H.O. Ad Hox. 1993. Global estimates for prevalence diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. Diabetes reporting group. **Diabetes Care** 16:157-177.
- McGavin, M.D. and J.F. Zachary. 2007. **Pathology Basis of Veterinary Disease**. 4th ed. Academic Press. Elsevier, Mosby. St Louis.
- Muhilal. 1991. Teori Radikal Bebas dalam Gizi dan Kedokteran. **Cermin Dunia Kedokteran** 73:9-11.
- Nugroho, A.N. 2006. **Hewan Percobaan Diabetes Mellitus: Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik**. Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Schnedl, W.J., S. Ferber, J.H. Johnson, and C.B. Newgard. 1994. Streptozotocin transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**. 43(11):1326-1333.
- Soegondo, S. 2007. **Diabetes**. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. **Diabetes** 50(6):536-546.
- Utomo, H., A. Hanafiah, L.H. Oen, F.D. Suyatna, dan N. Asikin. 1991. Radikal Bebas, peroxide lipid dan penyakit jantung koroner. **Medika** 5:373-379.
- Wang, Z. and H. Gleichmann. 1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. **Diabetes** 47(1):50-56.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H. King. 2004. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** 27:1047-1453.
- Wilson, G.L. and S.P. LeDoux. 1989. The role of chemical in the etiology of diabetes mellitus. **J. Toxicol. Pathol.** 17:357-3 62.